

審査の結果の要旨

氏名 鹿嶋 晃平

低出生体重児の2大カテゴリーは早産児と Small for Gestational Age (SGA)児であるが、いずれも周産期に子宮内外で栄養不良や低酸素に曝露され、生存のための適応を強いられることが多く、「生存のための適応の過程で、成人後の疾病体質が形成される」DOHaD仮説が支持を集めている。この「疾病体質の形成」にはエピジェネティックなメカニズムが関与しているのではないかと考えられている。早産児・低出生体重児の分野では、DNAメチル化と在胎週数や出生体重などの臨床情報との関連を調べるエピゲノムワイド関連解析(EWAS)は世界中で行われているが、遺伝子発現との関連は検討されておらず、周産期に起こったメチル化変化の生後の持続(エピジェネティックメモリー)に関しては結論が出ていない。本研究は単核球分離後検体からDNA・RNAの同時抽出を行い、DNAメチル化解析および遺伝子発現解析に基づいて早産およびSGAに関連したエピジェネティック変化を調べ、生後にも持続する変化を探索したものであり、下記の結果を得ている。

1. 臍帯血検体 110 サンプルを用いて、在胎週数ないし出生体重 SD スコアについての臍帯血での EWAS を行った結果、27,619 箇所の在胎週数関連 CpG および 150 箇所の SD スコア関連 CpG を認めた(両者併せて 10.877RefSeq 遺伝子)。パスウェイ解析では、メチル化率減少型 CpG(週数が進むとメチル化率が減少する CpG)では NF-kappa B signaling pathway などが、メチル化率増加型 CpG では PI3K-Akt signaling pathway などがエンリッチされていた。
2. EWAS の結果、在胎週数ないし出生体重 SD スコアと関連のあった CpG 計 27,701 箇所に対応する遺伝子発現プローブ 9,691 個(7,813RefSeq 遺伝子)について、臍帯血検体 55 サンプルを用いて、遺伝子発現関連解析を行ったところ、出生体重 SD スコアと FDR 基準で関連のある遺伝子発現プローブはなかった。一方、在胎週数と関連のある発現プローブは FDR 基準で 401 個(369RefSeq 遺伝子)、 $p < 0.05$ (補正なし)の基準で 1,834 個であった。 $p < 0.05$ (補正なし)のプローブでパスウェイ解析を行ったところ、発現増加型(週数が進むと発現が増加)のプローブでは、NF-kappa B signaling pathway などが、発現減少型では PI3K-Akt signaling pathway などがエンリッチされており、EWAS 後パスウェイ解析の結果と矛盾しなかった。
3. 上記 2.において、FDR 基準で採択した在胎週数関連遺伝子発現プローブ 401 個と対応する在胎週数関連 CpG 1,085 箇所の組み合わせ 1,179 通りのうち、臍帯血検体 55 サンプルで、 $p < 0.05$  の基準で関連が確認されたのは 672 通り(RefSeq 遺伝子として 257

個)であった。このうち負の相関(メチル化率が増加すると遺伝子発現が減少する関係)をとる組み合わせが 426 通りで、正の相関をとる組み合わせは 246 通りであった。在胎週数関連 CpG 27,619 箇所のうち、対応する遺伝子発現に在胎週数との関連を認め、DNA メチル化と遺伝子発現の直接の相関を認めたものは 628 箇所であった。

4. 47 人の児の臍帯血および生後児血メチル化データを用いて、臍帯血-生後児血間メチル化率相関係数を算出した。在胎週数関連 CpG 27,619 箇所のうち、相関係数が 0.7 以上のもの(エピジェネティックメモリーの候補)は 2,093 箇所であった。在胎週数関連メチル化変化の中には生後にも持続する候補を見いだすことができ、早産児に在胎週数関連のエピジェネティックメモリーが起こることが示唆された。これら 2,093 箇所について、クロマチン状態を調べたところ、抑制性ポリコームの結合部分がエンリッチされていた。また、これら 2,093 箇所のうち、発現との相関を認めたものは 63 箇所であり、DNA メチル化-遺伝子発現の相関が負のもの(メチル化率が増加すると遺伝子発現が減少する)は 38 箇所、正のものは 25 箇所であった。左記 63 箇所のうち、最も個数の多かったのが、*CMYA5*(12 箇所)であり、その他複数箇所の CpG サイトが検出された遺伝子は *UCN*、*SLC12A7*、*TNFAIP2*、*NGF*、*TAS2R41*、*EXOC3L4*、*LPPR2*であった。

本研究は早産および SGA 児の分野において、(1)日本における血液検体でのエピゲノムワイド関連解析(EWAS)を行った最初の研究であり、(2)同一の単核球分離後サンプル内で遺伝子発現も広範囲に検討した世界で初めての EWAS 研究である。エピゲノムワイド関連解析(EWAS)により、多くの在胎週数関連 DNA メチル化変化、およびいくつかの出生体重 SD スコア関連メチル化変化を確認し、前者においてはこれまで検証されていなかった同一検体内での遺伝子発現との関連も一定数確認した。在胎週数関連メチル化変化の中には生後にも持続する候補を見いだすことができ、早産児に在胎週数関連のエピジェネティックメモリーが発生することが示唆された。これらのエピジェネティックメモリーにはポリコーム蛋白の結合などクロマチン状態の傾向が存在することも新たに発見され、また必ずしも遺伝子発現との関連が確認できない場合や、DNA メチル化増加に伴い遺伝子発現が増加するなど定説にそぐわない場合も一定数見られることが分かり、エピジェネティックメモリーの形成にはメチル化そのものだけではなく、メチル化以外のエピジェネティックなメカニズムが関与していると考えられた。研究の限界として、(1)サンプル数が限られていること、(2)2施設のみからの検体収集、解析によりサンプル数が異なるなど集団バイアスが懸念されること、(3)エピジェネティックメモリーの評価時期が予定日付近のみになってしまったこと、(4)あくまで血球の評価に留まってしまったこと、(5)DNA メチル化変化と生後の表現型との関連が検討できていないことなどが挙げられるが、研究手法やその組み立て、考察は適切であった。本研究は今後の日本の新生児 EWAS 研究の基盤になるものと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。